



Strukturer af membranproteiner nøglen til rationelt lægemiddeldesign

Hald, Helle; Mirza, Osman Asghar

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2010

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Hald, H., & Mirza, O. A. (2010). Strukturer af membranproteiner: nøglen til rationelt lægemiddeldesign. *Lægemiddelforskning*, 2010, 13-15.

Strukturer af membranproteiner: Nøglen til rationelt lægemiddeldesign

De fleste lægemidler virker ved at binde sig til proteiner i cellemembranen. Derfor er kendskab til humane membranproteiner en uvurderlig hjælp, når man designer nye lægemidler, men desværre er det ekstremt svært at bestemme deres strukturer. Små krystaller med tilsvarende membranproteiner fra bakterier kan afsløre strukturen ved brug af intens røntgenstråling.

Af Helle Hald og Osman Mirza

Membranproteiner er cellernes omstillingsbord – forbindelsen mellem omverdenen og cellernes indre – og opklaring af deres strukturer er i den absolutte frontlinje af biokemisk forskning. I dag kan man ved hjælp af røntgenkrystallografi bestemme den tredimensionelle opbygning af de store proteinmolekyler helt ned til en detaljeringsgrad, der afslører de indbyrdes positioner af de enkelte atomer i proteinet. Oplysningerne er nyttige for forståelsen af membranproteineres virkningsmekanismer, og de kan anvendes i praksis ved udvikling af nye lægemidler. Størstedelen af alle lægemiddelforbindelser virker nemlig ved at binde sig til et membranprotein, og derfor er kendskab til membranproteineres strukturer en

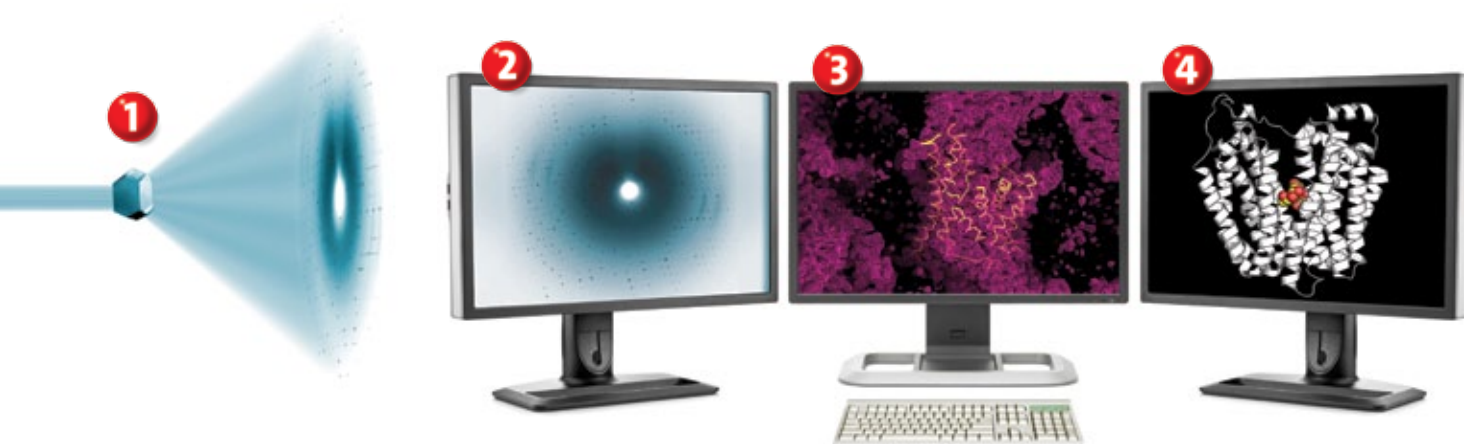
stor hjælp, når man skal designe nye lægemidler. Det er simpelt hen nemmest at fremstille en nøgle til en lås, når man kender låsens form.

Imidlertid er det ekstremt svært at opklare strukturen af humane membranproteiner, og på verdensplan har man endnu kun bestemt den atomare opbygning af 12 af menneskets i alt 7000 membranproteiner. Problemet er, at proteinerne kolliderer og ændrer form, når de fjernes fra deres naturlige miljø i den fedtholdige cellemembran. Derfor skal de pakkes ind i sæbemolekyler, når de tages ud af membranen og dyrkes som krystaller, og ofte lykkes det kun at fremstille krystaller, som er så små, at det er umuligt at bestemme proteinets struktur selv med intens røntgenstråling fra store accelerators.

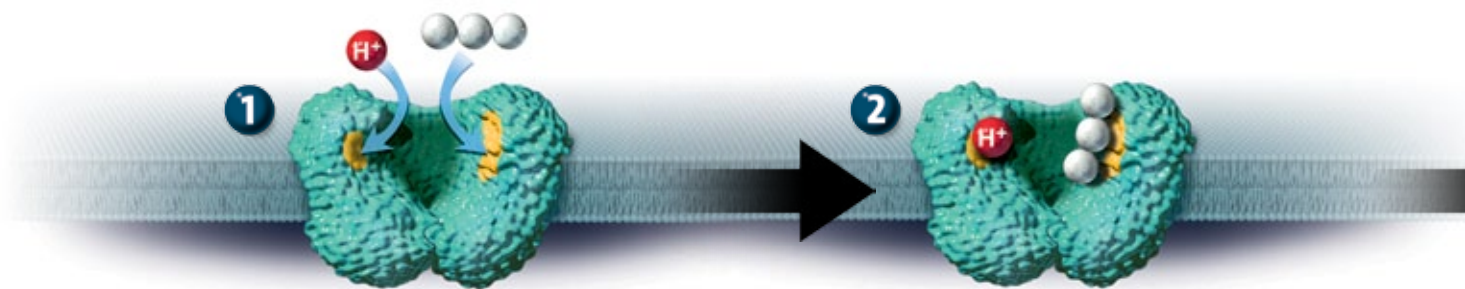
I de seneste par år har området imidlertid været inde i en rivende udvikling, og nye metoder til proteinfremstilling og krystallisation har øget antallet af kendte strukturer af membranproteiner fra et halvt hundrede stykker i 2000 til omkring 250 i dag. De fleste strukturer stammer fra bakterier.

Peptidtransportør i tarmen

Vi fokuserer på et membranprotein i tarmcellerne, som spil-



Opklaring af proteinstruktur: **1** En gradvist roterende proteinkrystal bestråles med intens røntgenstråling. **2** Krystallen spredte røntgenstrålen, og der dannes spredningsmønstre. **3** Ud fra spredningsmønstrene fremstilles et tredimensionelt kort over elektronernes placering i krystallen. **4** Kortet bruges til at bygge en model af proteinets struktur, som viser de enkelte atomers art og indbyrdes positioner i proteinmolekylet.

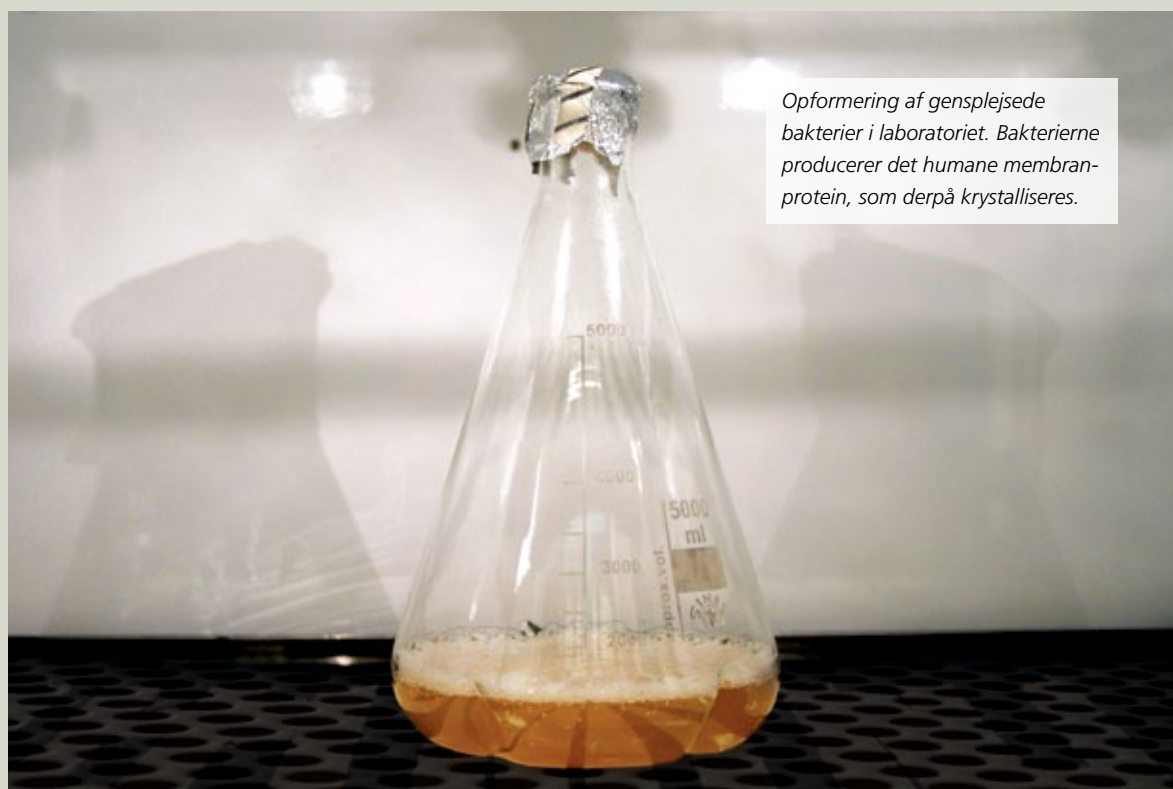


MODEL AF PEPTIDTRANSPORTØREN

Virkningsmekanismen af den humane peptidtransportør er ikke opklaret eksperimentelt, men der er udviklet en teoretisk model, som er baseret på strukturel viden om andre typer transportører:

I hvilepositionen befinder peptidtransportøren sig i en strukturel form, hvor de aktive områder vender udad på

cellens overflade. Områderne, som består af aminosyrer, er bevarede gennem evolutionen og er derfor uændrede mellem bakterielle og humane peptidtransportører. Det er kendskabet til disse aminosyrers tredimensionelle placering, der kan udnyttes til at designe lægemidler, som genkendes af peptidtransportøren.



Opformering af gensplejede bakterier i laboratoriet. Bakterierne producerer det humane membranprotein, som derpå krystalliseres.

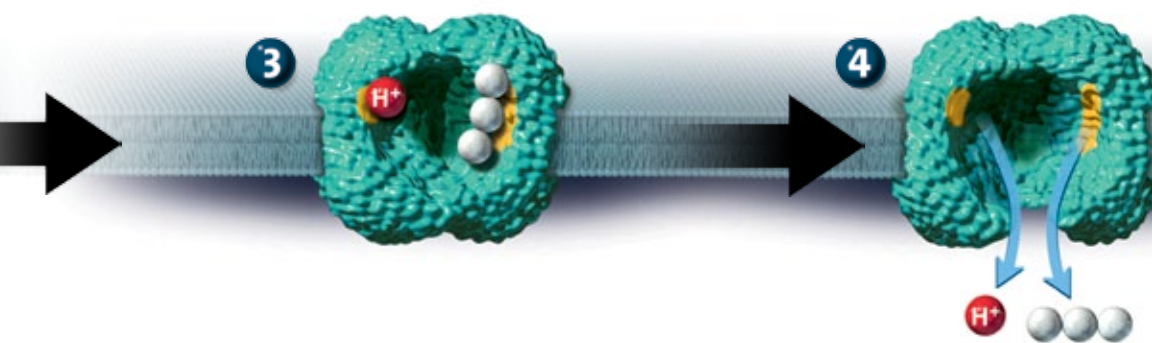
KRYSTALDYRKNINGENS SVÆRE KUNST

Krystaller er opbygget af millioner af ens molekyler arrangeret i lange rækker af symmetriske formationer. For at lave en krystal af et protein kræves der store mængder af proteinet, som typisk fremstilles i genmodificerede organismer såsom bakterier eller gær. Vi opformerer bakterierne i laboratoriet, hvor de producerer den bakterielle peptidtransportør, inden vi slår dem i stykker og isolerer proteinet fra celleresterne. Når man arbejder med membranproteiner, er det ofte et problem, at værtsorganismen kan dø, hvis man tvinger den til at producere for store mængder protein.

Den største udfordring er imidlertid fremstillingen af selve proteinkrystallen. Det er meget vanskeligt at krystallisere

membranproteiner, fordi de består af en vandafvisende og en vandelskende del, som henholdsvis befinder sig inde i cellemembranen og udenfor cellen. Proteinets kombinerede hydrofobe og hydrofile egenskaber vanskeliggør den tætte pakning af molekyler, der kræves for at opbygge en krystal, fordi de to dele afviser hinanden på samme måde som ensrettede poler på to magneter.

Løsningen er at tilsætte en mild sæbeopløsning til opløsningen med proteinet. Sæben består af små molekyler med en vandafvisende og en vandelskende del, og når sæbemolekylerne blander sig med proteinmolekylerne, formindskes den indbyrdes frastødning mellem proteinerne.



Når transportørens substrater – en proton samt et peptid – er til stede ❶, vil den gensidige tiltrækningskraft mellem de aktive områder og substraterne føre til dannelsen af et kompleks, hvor protonen og peptidet bindes til transportøren ❷. Som følge af peptidbindingen ændres transportø-

rens form, så der opstår et mellemstadium. Dernæst dannes et stadium ❸, hvor protonen og peptidet vender indad i cellen. Dette medvirker til, at både protonen og peptidet frigøres fra peptidtransportøren ❹. Denne tomme peptidtransportør ændrer derefter form tilbage til hvilepositionen.

ler en central rolle, når medicin indtages i tabletter, hvilket er tilfældet med langt de fleste lægemidler. Forudsætningen for, at medicinen virker, er, at tabletten først bliver nedbrudt i mave-tarm-systemet. Derefter skal det aktive lægemiddelstof transporteres fra tarmen over i blodet, som fører stoffet hen til det organ, hvor det skal udøve sin effekt.

Transporten fra tarmen til blodbanen finder ofte sted med hjælp fra membranproteiner, som sidder på cellerne i tarmvæggen. De kaldes for transportører og sender små molekyler, som ellers ville være blevet tilbageholdt i tarmen, ind i blodet. Vi forsker i den humane peptidtransportør hPEPT1, som fragter små peptider med to eller tre aminosyrer gennem tarmvæggen. Peptiderne er typisk nedbrydningsprodukter fra føden, men da transportøren er ret uspecifik, kan den også sende peptidlignende lægemiddelstoffer ind i blodet, og det gør membranproteinet yderst interessant i forbindelse med design af lægemidler.

Til trods for peptidtransportørens vigtige funktion kender man ikke strukturen, fordi det er meget vanskeligt at arbejde med menneskelige membranproteiner i laboratoriet. Derfor har vi valgt at undersøge en række peptidtransportører, som evolutionært er relateret til hPEPT1. Et eksempel er et membranprotein fra kolibakterier, som kaldes YjDL, og som er bakteriens version af transportøren. Bakteriers membranproteiner er ofte mere stabile end de tilsvarende humane proteiner, og derfor er de som regel nemmere at arbejde med. Strukturel information om kolibakteriens transportør kan bruges til at designe en model af menneskets peptidtransportør med hjælp fra en computer, fordi den overordnede struktur af de to evolutionært beslægtede proteiner må forventes at være meget ens.

Røntgenkrystallografi på accelerator

Vi har udviklet en metode til at producere store mængder

af peptidtransportøren YjDL i genmodificerede bakterier, der fungerer som små proteinfabrikker, og vi har fremstillet små krystaller af membranproteinet, som vi har undersøgt på en stor partikelaccelerator i Schweiz. Swiss Light Source er en ringformet synkrotron, hvori bundter af elektroner cirkulerer ved nær lysets hastighed. Flere steder i ringen passerer elektronerne særlige konfigurationer af magneter, der kaldes undulatorer. De får elektronerne til at løbe slalom, og når elektronernes baner krummes, udsender de meget intens røntgenstråling. Den stærke stråling er fokuseret i en ekstremt tynd stråle, hvilket gør det muligt at bestemme proteinstrukturer ud fra langt mindre krystaller end normalt.

Til bestemmelse af et proteins tredimensionelle struktur bruger vi en metode, som kaldes røntgenkrystallografi. Ved eksperimenterne bestråles en gradvist roterende krystal af proteinet med røntgenstråling. Røntgenstrålen spredes af de elektroner, som omgiver atomerne i krystallen, hvilket resulterer i spredningsmønstre, hvis udseende afhænger af proteinmolekylets struktur. Ud fra mønstrene beregner man på en computer et tredimensionelt kort over positionerne af elektronerne i proteinet. Med dette kort som udgangspunkt bygger man så en model over proteinets rumlige facon og atomstruktur, som viser de enkelte atomers art og indbyrdes positioner i proteinet.

Vore undersøgelser af krystallerne med bakteriens peptidtransportør tegner lovende, men resultaterne er endnu ikke gode nok til, at vi kan bestemme strukturen. Derfor arbejder vi med at optimere forskellige trin i processen, og vi håber på snart at få resultater af en kvalitet, som kan føre til strukturbestemmelse af YjDL. På den måde vil vi få nyttige oplysninger om den tilsvarende humane peptidtransportør, som kan udnyttes til design af nye lægemidler til indtagelse gennem munden.



Ph.d. Helle Hald er postdoc på Institut for Medicinalkemi
Ph.d. Osman Mirza er lektor på Institut for Medicinalkemi